

## Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en híbrido de papaya a partir de ápices de plantas *in vitro*

Jorge Gallardo Colina\*, Rafael Gómez Kosky, Maritza Reyes, Bárbara Ocaña Díaz, Idalia Herrera O'farri y Marisol Freire Seijo. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: gallardo@ibp.co.cu

### RESUMEN

En el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) las afectaciones por virus disminuyen en más de un 50% la producción de las plantaciones. La transformación genética constituye una vía alternativa para la obtención de nuevas variedades resistentes a este patógeno. El principal objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología para la transformación de un híbrido de papaya mediante *A. tumefaciens*. Como material vegetal se utilizaron ápices (3-5 mm) de plantas *in vitro* de papaya. Se emplearon las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105 y AT 22-60 que contenían el plásmido pCAMBIA 3301. Se establecieron las condiciones de co-cultivo para lograr una integración del gen foráneo en el genoma del híbrido. La integración de la secuencia transgen fue confirmada por la expresión del gen GUS en tejidos de los explantes mediante el ensayo histoquímico. Se logró la mayor expresión transitoria de la  $\beta$ -glucuronidasa en los ápices co-cultivados a 28°C durante cinco días utilizando la cepa EHA 105 con una frecuencia de 20 puntos azules como promedio por ápice infestado. Fue posible eliminar las quimeras luego del cuarto subcultivo después de la transformación y las líneas obtenidas fueron resistentes a BASTA®. El resultado final demostró que es posible obtener plantas transformadas del híbrido de papaya a partir de sus ápices meristemáticos.

Palabras clave: *Carica papaya*, genes, gus, plásmido

### ABSTRACT

In papaya (*Carica papaya* L.) viral infections can decrease production by more than 50%. Genetic transformation consists of an alternative means of obtaining new varieties, which are resistant to this pathogen. The main objective of the present work was to develop a methodology for the transformation of a papaya hybrid via *A. tumefaciens*. As plant material, shoot-tips (3-5 mm) from *in vitro* papaya plants were used. The *Agrobacterium tumefaciens* strains EHA-105 and AT 22-60 were employed, which contained the plasmid pCAMBIA 3301. Co-culture conditions were established to achieve the integration of the foreign gene into the genome of the hybrid. The integration of the transgene sequence was confirmed by the expression of the GUS gene in the tissues of the explants through histochemical assay. The greatest transient expression of  $\beta$ -glucuronidase was achieved with the shoot-tips co-cultured at 28°C during five days, using the strain EHA 105 with an average frequency of 20 blue foci per infected shoot-tip. Complete transgenic plants were obtained 4 subcultures after transformation and these line obtained were resistant to BASTA®. The final results demonstrate that it is possible to obtain plants transformed into hybrids of papaya from its meristematic apices.

Key words: *Carica papaya*, genes, plasmid, gus

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) se ha incrementado en los últimos años, debido a la alta demanda tanto en el mercado interno como externo. Sin embargo, las afectaciones por virus disminuyen en más de un 50% la producción de las plantaciones. Se tiene en cuenta que las mismas solo se mantienen en producción uno o medio año y este cultivo se puede mantener en cosecha dos años con altos rendimientos. Además, las pérdidas post-cosecha están estimadas entre un 20-22% (FAO, 2002) de lo real cosechado. Si se tiene en cuenta lo anteriormente expuesto se considera que el total de las pérdidas asciende a cerca de un 60-65% de la producción total estimada de la plantación.

La principal variedad que se cultiva en Cuba es la Maradol Roja. La misma a pesar de sus ventajas es susceptible a las principales enfermedades virales, además de la rápida maduración de los frutos post-cosecha, lo que limita en cierta medida la transportación a grandes distancias y una mayor estancia en los mercados. Posada *et al.* (2000) obtuvieron un híbrido (IBP42-99) a partir del cruzamiento de esta variedad con la Strawberry, el cual además de mantener las características positivas posee menor peso y tamaño de los frutos y un brix mayor que la variedad Maradol Roja pero mantiene la susceptibilidad a los virus y la característica de frutos climatéricos. Es por ello que la transformación genética constituye una vía alternativa para mejorar estas características en el híbrido.

Diferentes autores han desarrollado metodologías para la transformación genética de variedades de papaya: a partir de discos del eje hipocotilo (Fitch 1993), y embriones somáticos (Fitch *et al.*, 1993; Cabrera-Ponce *et al.*, 1996; Mas *et al.*, 2002), sin embargo, para los híbridos no se pueden utilizar estas metodologías. En este trabajo la  $F_1$  ha sido mantenida por micropropagación sin tener que realizar cruzamientos y retrocruces. Sanford (1988) en papaya utilizó discos de hojas para la transformación y podría ser aplicada en los trabajos de transformación del híbrido de papaya, sin embargo no se ha logrado la regeneración de plantas a partir de este tipo de explante. Ante esta problemática el principal objetivo del presente trabajo fue desarrollar un protocolo para la transformación genética de un híbrido de papaya (IBP42-99) a partir de un tejido somático mediante *Agrobacterium tumefaciens* y lograr la regeneración de plantas a partir del mismo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron ápices procedentes de plantas *in vitro* del híbrido de papaya (IBP42-99) con un tamaño entre 3 y 5 mm. Previamente se había estudiado su capacidad de regeneración.

### Transformación genética

#### Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y plásmido

En los eventos de transformación genética fueron utilizadas las cepas de *A. tumefaciens* EHA 105 y AT 22-60 con el plásmido pCAMBIA 3301 (CAMBIA; 1997) de 5 077 pares de bases que contiene dos genes que se expresan en plantas:

- El gen *bar* (Thompson *et al.*, 1987) que codifica para la enzima fosfotricina N-acetil transferasa que confiere resistencia a los herbicidas que contengan fosfotricina como producto activo. Este gen se encuentra regulado por el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y el terminador 35S poliadenilado del mismo virus.
- El gen *gus* (Jefferson *et al.*, 1987) que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y está regulado por el mismo promotor del gen *bar* y por la secuencia terminadora T-NOS poliadenilada de la enzima nopalina sintetasa de *Agrobacterium*.

#### Pre-tratamiento

Antes de la inoculación con *A. tumefaciens* a los ápices se les retiraron las hojas con la ayuda del microscopio estereoscópico con el objetivo de disminuir el área foliar y dejar el meristemo más expuesto. Luego se realizaron pequeñas heridas en la parte superior del ápice, para que la bacteria penetrara hasta los tejidos del mesófilo.

#### Infección

Se tomaron dos tubos de ensayo con medio de cultivo LB suplementado con antibióticos, se les inoculó la

bacteria y luego se incubaron a 28°C durante 24h. Posteriormente se tomaron 200 microlitros de la suspensión bacteriana y se inocularon en Erlenmeyer de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio de cultivo de inducción (Pérez 2000) y se colocaron en zaranda por 24h a 28°C y 200 rpm, el cultivo creció hasta una  $DO_{600} = 1$ .

La inoculación de los ápices se realizó en la cabina de flujo laminar con el empleo de placas de Petri. Los explantes fueron sumergidos en el cultivo de la bacteria, se dejaron reposar durante 10 minutos y luego se secaron sobre papel de filtro (previamente esterilizado). Posteriormente se colocaron en el medio de cultivo de multiplicación de híbridos de papaya (Gallardo *et al.*, 2002) y se incubaron a 27°C y oscuridad.

### Tinción y evaluación

En todos los experimentos de transformación genética, transcurridos los periodos de co-cultivo los ápices fueron lavados con agua desionizada estéril y se colocaron en tubos de centrifuga Eppendorf con capacidad de 1.5 ml. Para la tinción de los ápices transformados se les adicionó X-Gluc y metanol (80/20) y se colocaron a 37°C y oscuridad durante 48 h para realizar las evaluaciones que consistieron en cuantificar el número de puntos azules por ápice.

#### Efecto del tipo de cepa bacteriana y el tiempo de co-cultivo

En este experimento se compararon las dos cepas de *A. tumefaciens* antes mencionadas en combinación con diferentes tiempos de co-cultivo, donde los explantes luego de la infección se colocaron en una incubadora a 37°C y oscuridad. En este trabajo se utilizaron cinco tratamientos: 2, 3, 4, 5 y 6 días de cocultivo.

#### Influencia de la temperatura sobre la eficiencia de transformación de la bacteria en los tejidos del explante

Se evaluó la influencia de la temperatura en la eficiencia de integración del gen foráneo por parte del *A. tumefaciens* sobre los ápices. Para ello se transformaron los ápices y se colocaron en dos temperaturas: 21°C y 27°C. Para el tiempo de co-cultivo y se utilizó la cepa con la cual se lograron los mejores resultados del experimento anterior.

#### Influencia de la edad de las plantas *in vitro* sobre la eficiencia de la transformación

Fueron transformados ápices de plantas *in vitro* con una y tres semanas de subcultivo en medio de cultivo de multiplicación de híbridos de papaya (Gallardo *et al.*, 2002). Para ello se tuvieron en cuenta los mejores resultados de los experimentos anteriores.

## Determinación del número de subcultivos para eliminar las quimeras

Se continuaron los trabajos de transformación con los ápices teniendo en cuenta los mejores resultados de los estudios anteriores y luego se colocaron los explantes en medio de cultivo de multiplicación de híbrido de papaya (Gallardo *et al.*, 2002) con antibiótico (Timentina 200 mg.l<sup>-1</sup>).

Para determinar el subcultivo donde aparecían las plantas transgénicas libres de quimeras, se colocaron las mismas en medio de cultivo de multiplicación de híbridos con BASTA® (10 mg.l<sup>-1</sup>). En este estudio se utilizaron plantas *in vitro* en diferentes subcultivos: segundo, tercero y cuarto. Se evaluó el porcentaje de supervivencia. Posteriormente las plantas seleccionadas se colocaron en tubos de centrífuga Eppendorf para realizar la tinción y evaluar la integración estable del gen *gus*.

Todos los experimentos se realizaron tres veces como repetición. Los resultados fueron procesados mediante el paquete estadístico SPSS. Versión 9.0 a los que se le realizaron ANOVA de clasificación simple previa comprobación de la homogeneidad de varianzas y las medias se compararon a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan para una significación del 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto del tipo de cepa bacteriana y el tiempo de co-cultivo

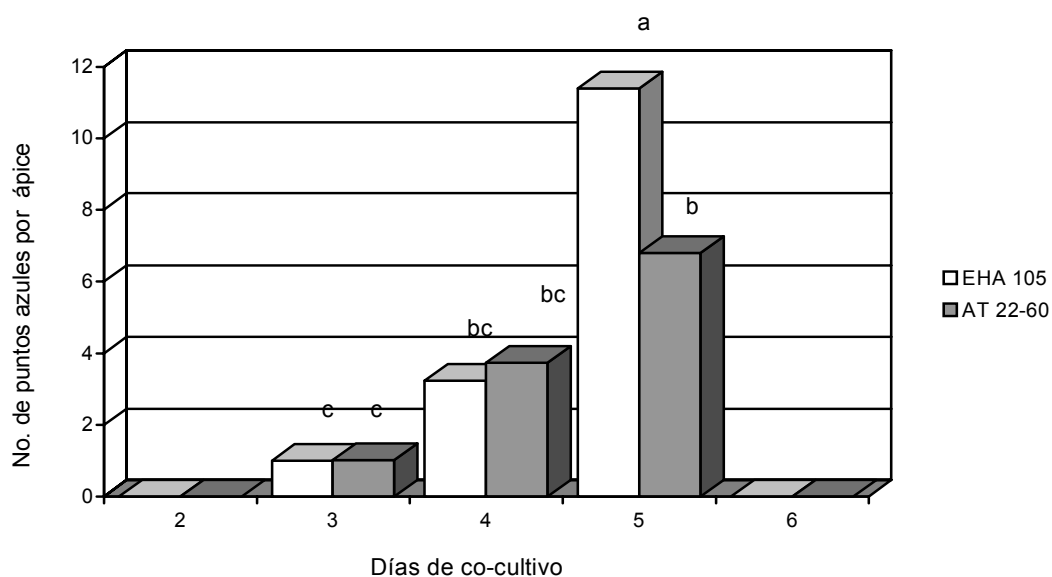
Se logró la expresión transitoria de la  $\beta$ -glucoronidasa en ápices de papaya del híbrido

utilizado. Al estudiar el tiempo de co-cultivo entre dos y cinco días, se comprobó que con el aumento en días se logró incrementar el número de puntos azules por ápice (Figura 1). En el tratamiento con 6 días no se pudieron evaluar los explantes, debido a la necrosis del meristemo del ápice provocada por el sobrecrecimiento de la bacteria, lo cual imposibilitó la regeneración de plantas a partir de los mismos.

Aunque ocurrió un crecimiento notable de la bacteria, en el tratamiento cinco con la cepa EHA-105 se obtuvo el mejor resultado. Se alcanzaron 11.4 puntos azules por explante, siendo estadísticamente superior al resto de los tratamientos. En el tratamiento con 2 días de co-cultivo no hubo expresión transiente con ninguna de las dos cepas. En los tratamientos restantes no hubo diferencias significativas entre las cepas estudiadas.

Cao *et al.* (1998) utilizaron para la transformación en hojas de *Viccinium s/l.* dos cepas de *A. tumefaciens* y tiempos de co-cultivo entre dos y cinco días. Los mejores resultados fueron obtenidos con la cepa EHA 105 y los mayores tiempos de co-cultivo, similares a los del presente trabajo. En papaya Fitch *et al.* (1993) tomaron para los trabajos de transformación embriones somáticos y obtuvieron la mejor expresión transitoria con tres días de co-cultivo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los ápices son tejidos más diferenciados lo cual puede dificultar la infección.

Con la eliminación del área foliar se producen heridas que le permiten a la bacteria penetrar al tejido. Además, en esta zona se encuentran las yemas axilares y en las mismas aparecieron regiones



\*Medias con letras diferentes difieren según Duncan para P=0.05%

Figura 1. Influencia del tiempo de co-cultivo en la expresión transitoria de la  $\beta$ -glucoronidasa en ápices del híbrido de papaya IBP42-99 con el empleo de las cepas de *A. tumefaciens* EHA-105 y AT 22-60.

transformadas las cuales en sucesivos subcultivos pueden originar plantas completamente transformadas. De forma general, la eliminación de las hojas favoreció la efectividad de la infección.

La mayor área de tejido transformado se encontró en la zona superior del ápice donde se localizan las células más jóvenes (Fig.1), las cuales están en constante actividad metabólica y de división celular. Además, presentan una pared celular delgada y poco lignificada lo que permite una mejor inserción del gen foráneo (Cañal *et al.*, 2001).

Trick y Finer (1998) aplicaron la sonicación combinada con la inoculación de *A. tumefaciens* para provocar heridas en los explantes lo que aumentó significativamente los niveles de expresión GUS en callos transformados de *Brassica napus*.

En estudios con manzana (*Malus x domestica*) donde se han empleado hojas como blancos para la transformación se han obtenido los mejores resultados con los mayores tiempos de co-cultivo (DeBondt *et al.*, 1994) aunque no recomiendan tiempos mayores de cuatro días por la dificultad en eliminar el *A. tumefaciens* de los tejidos de las hojas. Por otra parte (Hammerschlag *et al.*, 1997) sugieren

colocar los explantes en un medio de cultivo con pH bajo, seguido de una corta exposición con altos niveles de Cefotaxima para eliminar la bacteria (*A. tumefaciens*) de los explantes provenientes de una prolongada co-cultivación.

### Influencia de la temperatura sobre la eficiencia de transformación de la bacteria en los tejidos del explante

Se logró la mejor infección de *A. tumefaciens* sobre los explantes a 27°C, siendo significativamente superior al tratamiento con 21°C, donde la cantidad de puntos azules por ápices fueron casi nulos (Tabla 1). Con la temperatura más alta se obtuvo un mayor crecimiento de la bacteria y de esta forma se logró una mejor acción de la misma sobre los explantes. Fullner y Nester (1996) estudiaron el comportamiento y el mecanismo de transferencia T-ADN en *Agrobacterium* para lo cual utilizaron 16 cepas. Ellos plantearon que la mayor eficiencia se logró con temperaturas próximas a los 22°C, también que a partir de los 25°C ocurría un decline en la misma y por encima de los 28°C era casi nula. Sin embargo, Cao *et al.* (1998) utilizaron 28°C de temperatura para la transformación vía *A. tumefaciens* en discos de hojas de *Vaccinium s/l*, donde alcanzaron resultados desde 17.8 hasta 27.1 puntos por explante.

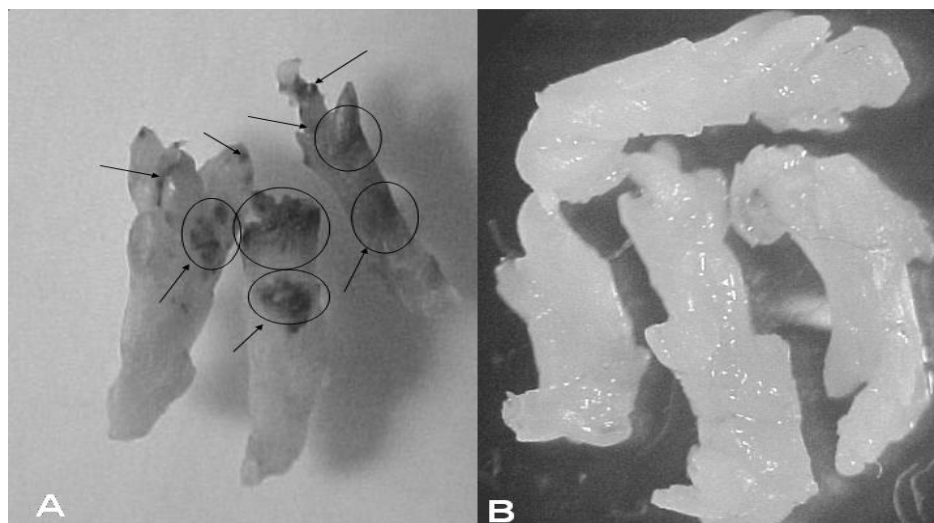


Figura 1. Ápices del híbrido de papaya IBP 42-99. A. ápices con 5 días de co-cultivo con la cepa de *A. tumefaciens* EHA-105. B. ápices sin transformar.

Tabla 1. Expresión de la capacidad de transformación de la cepa de *A. tumefaciens* EHA-105 a dos temperaturas sobre ápices del híbrido de papaya IBP42-99.

Tratamientos	Número de puntos azules por ápice
Co-cultivo a 21°C	0.75 b
Co-cultivo a 27°C	4.25 a
±EE	1.54

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ , según la prueba de rangos múltiples de Duncan.



### Influencia de la edad de las plantas *in vitro*

La edad de las plantas *in vitro* mostró una influencia marcada en la transformación de los ápices. Al utilizar ápices provenientes de plantas con tres semanas de subcultivo, se obtuvo la mayor expresión del gen con un total de 20 puntos azules por ápice como promedio (Tabla 2), significativamente superior al tratamiento donde se utilizaron ápices con una semana de subcultivo. Ello puede estar dado por la diferencia en el metabolismo de los tejidos de las mismas, dependiendo de su estado de crecimiento ya que en una semana las plantas *in vitro* se encuentran recuperándose del estrés provocado y comienzan el crecimiento. Sin embargo, con tres semanas las mismas se encuentran con un crecimiento continuo. Cao *et al.* (1998) estudiaron este parámetro y en el 40% de los cultivares de *Vicinia s/l* la edad de las plantas *in vitro* en el momento de tomar los explantes influyó significativamente en la transformación. No obstante, en su caso utilizaron como explantes discos de hojas donde el metabolismo de las células no es igual que el de los tejidos de los ápices.

### Determinación del número de subcultivos para eliminar las quimeras

Se logró un 0.98% de supervivencia de las plantas *in vitro* en medio de cultivo de selección luego del 4<sup>o</sup> subcultivo. En los demás tratamientos (dos y tres subcultivos) no se obtuvo supervivencia de las mismas. Si existieron yemas axilares transformadas en este periodo, deben haber muerto debido a la pérdida de su conexión con el medio de cultivo, provocada por la necrosis de las plantas *in vitro*. Las plantas seleccionadas se multiplicaron como líneas independientes. Cuando se les realizó la tinción, el 100% de las líneas mostró una expresión estable de la  $\beta$ -glucoronidasa (Figura 3). Tian *et al.* (2002) lograron plantas que mostraran la expresión del gen *gus* en tabaco (*Nicotiana tabacum*), col (*Brassica oleracea* L) y alfalfa (*Medicago sativa* L), al transformar vía organogénesis discos de hojas, discos de eje hipocotilo y peciolo, respectivamente mediante *A. tumefaciens*.

Cho *et al.* (2003) transformaron callos de *Avena sativa* L. procedentes de ápices meristemáticos y lograron una frecuencia de regenerar plantas transgénicas de un 8.0%. Zhu *et al.* (2004) utilizaron para la transformación en papaya (*Carica papaya* L) vía organogénesis, callos procedentes de segmentos de hipocotilo y refieren un 0.9% de eficiencia, similares a los del presente trabajo.

Tabla 2. Expresión *gus* en ápices del híbrido de papaya IBP tomados de plantas *in vitro* con diferentes tiempos de subcultivo

Tratamientos.	Número de puntos azules por ápice.
Una semana de subcultivo	6.37 b
Tres semanas de subcultivo	20 a
$\pm$ EE	2.55

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ , según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

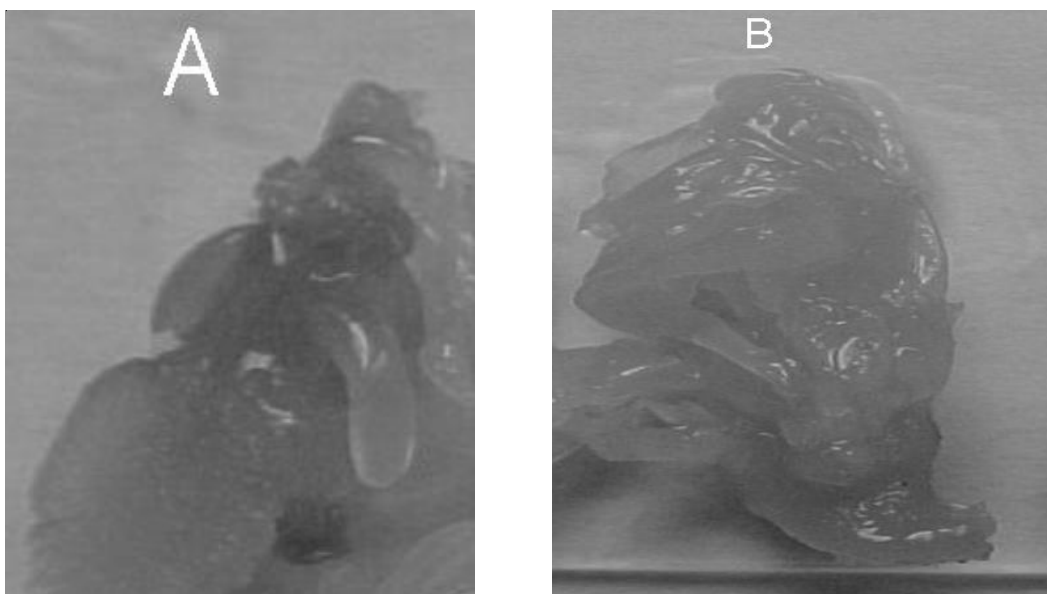


Figura.3 Expresión de la  $\beta$ -glucoronidasa en plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP42-99. A- planta transgénica, B- Control negativo.

## CONCLUSIONES

Se logró desarrollar un protocolo de transformación en un híbrido de papaya (IBP42-99) a partir de sus ápices meristemáticos, al utilizar la cepa de *A. tumefaciens* EHA-105, con un periodo de co-cultivo de 5 días a 27° C de temperatura y los explantes deben provenir de plantas *in vitro* con tres semanas después del subcultivo. Fue posible obtener plantas transgénicas del híbrido de papaya luego del 4<sup>to</sup> subcultivo después de la transformación y con el uso de la timentina (200 mg.l<sup>-1</sup>) como antibiótico, se logra evitar el desarrollo del *A. tumefaciens* en el medio de cultivo de multiplicación en el periodo de eliminación de las quimeras.

Con la utilización de este protocolo de transformación se pudieran obtener plantas transgénicas de híbridos de papaya con resistencia a los virus y retardo de la madurez de sus frutos post-cosecha y por tanto, aumentarían los rendimientos de las áreas cultivadas con los mismos, además puede ser utilizado en otros cultivares o especies las cuales sean recalcitrantes a la embriogénesis, como es el caso de los forestales.

## REFERENCIAS

- Cabrera-Ponce, JL, Vegas A y Herrera-Estrella L (1996) Regeneration of transgenic plants via somatic embriogénesis induced by *Agrobacterium rizogenes*. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 32: 86-90
- CAMBIA (1997) Cambia vectors Center of Application of Molecular Biology to International Agriculture
- Cañal, MJ, Rodríguez R, Fernandez B, Sanchez-Tames R, Majada J P (2001) Fisiología del cultivo *in vitro*. Biotecnología Vegetal 1: 3-9
- Cao, X, Liu Q, Rowland LJ, Hammerschlag FA (1998) Gus expression in blueberry (*Vaccinium s/l.*): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. *Plant Cell Reports* 18: 266-270
- Cho, M J, Choi H W, Okamoto D, Zhang S (2003) Expression of green fluorescent protein and its inheritance in transgenic oat plants generated from shoot meristematic cultures. *Plant Cell Rep.* 21:467-474.
- DeBondt, A, Eggermont K, Druart P, De Vil M, Goderis I, Vanderleyden J, Broekaert WF (1994) *Agrobacterium*-Mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh) an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep* 13: 587-593
- FAO, 2002. Prevention of post-harvest foot Losses fruits and vegetable. <http://www.fao.org/>
- Fitch, MMM (1993) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyls callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 22: 667-675
- Fitch, MMM, Manshardt RM, Gonsalves D Y Slightom JL (1993) Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Report* 12: 245-249
- Fullner, KJ y Nester EW (1996) Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 1498-1504
- Gallardo, J, Posada L, Gómez R, Mas L, Reyes M, Herrera I (2002) Micropropagación del híbrido Cubano de papaya (*Carica papaya* L.) IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal* 2 (4): 211-215
- Hammerschlag, FA, Zimmerman RH, Yadava UL, Hunsucker S, Gercheva P (1997) Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explant and on shoot regeneration. *J Am Soc Hortic Sci* 122: 758-763
- Jefferson, A, Kavavagh A y Bevan M (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907
- Mas, L, Chong B, Gómez R, Gallardo J, Herrera I y Reyes M (2002) Parámetros óptimos en la transformación de embriones somáticos de papaya empleando una pistola de genes de baja presión. *Biotecnología vegetal* 2 (2): 101-105
- Pérez, JB (2000) Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.). *Doctoraatsproefschrift Nr. 442 aan de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen van de K.U.L. Leuven*
- Posada, L, Gómez R, Reyes M, Herrera I y Norman O (2002) Obtención e implantación de *in vitro* de un nuevo híbrido de papaya (*Carica papaya* L.). Libro de resúmenes VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. junio 2002. p. 84. IBP. Santa Clara
- Thompson, C, Movva R, Tizard R, Crameri R, Davies J, Lauwereys M y Bottermann J (1987) Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces higroscopicus*. *EMBO J.* 9: 2519- 2523